

10/593430
IAP16 Rec'd PCT/PTO 19 SEP 2006

**PLATELET-RICH PLASMA GEL FOR BONE GRAFT FOR HEALING SKELETON
DEFICIENCY OF MAMMAL AND MANUFACTURING METHOD THEREOF**

Publication number: KR2001055742

Publication date: 2001-07-04

Inventor: YIM CHANG JOON (KR)

Applicant: KIM HYUNG GUN (KR); KIM JONG WAN (KR); KIM
JONG YEO (KR); KIM JUNG KEUN (KR); KIM SE WON
(KR); KIM SUNG O (KR); OSCOTEC INC (KR); SHIN
DONG RYUNG (KR); YIM CHANG JOON (KR); YIM
SUNG BIN (KR); YU YUNG MOK (KR)

Classification:

- international: **A61L27/00; A61L27/00;** (IPC1-7): A61L27/00

- european:

Application number: KR19990057036 19991213

Priority number(s): KR19990057036 19991213

Report a data error here

Abstract not available for KR2001055742

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 공개특허공보 (A)

(51) 。 Int. Cl. 7
A61L 27/00

(11) 공개번호 특2001 -0055742
(43) 공개일자 2001년07월04일

(21) 출원번호 10 -1999 -0057036
(22) 출원일자 1999년12월13일

(71) 출원인
주식회사 오스코텍
김정근
충남 천안시 안서동 산29
김성오
서울 용산구 이태원1동 22 -2번지 22동 7반 청화아파트 4동 1203호
임창준
경기 성남시 분당구 수내동 푸른마을아파트 305동 302호
김세원
충남 천안시 쌍용동 월봉현대아파트 503동 102호
김정근
경기 성남시 분당구 서현동 효자촌아파트 505동 404호
김중여
충남 천안시 쌍용1동 540 -2
김형진
서울 강남구 청담동 진흥아파트 5동 108호
신동령
서울 강남구 대치4동 933 -38 현대빌라 B동 102호
유영목
경기 성남시 분당구 서현동 시범우성아파트 214동 702호
임성빈
경기 성남시 분당구 정자동 정든마을우성아파트 405동 1402호
김종완
대전 서구 삼천동 가람아파트 15동 306호

(72) 발명자
임창준
경기 성남시 분당구 수내동 푸른마을아파트 305동 302호

(74) 대리인
이덕록

심사청구 : 있음

(54) 포유동물의 골격결손 치유시 골이식을 위한 농축혈소판혈장젤 및 그 제조방법

요약

본 발명은 포유동물에서 골격결손 치유시 골이식을 위해 사용되는 골 형성 활성(osteogenic promoting activity)이 있는 농축혈소판 혈장 겔에 관한 것으로, 본 발명 농축혈소판 혈장겔은 포유동물의 뼈분말에 10%의 염화칼슘 또는 클루콘산 칼슘, 트롬빈 및 혈장에서 분리한 농축혈소판을 일정 비율로 혼합함으로써 제조되어지며 골이식재료에 섞어 골격결손 부위에 이식할 경우 골이식재료의 골형성능이 훨씬 촉진되고 개선되는 것으로 확인되었다.

대표도

도 2b

색인어

농축혈소판 혈장 겔(platelet -rich plasma gel), 골 이식(bone graft)

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 개의 치조골 결손부 주위에 광물성 골 이식재료만을 이식한 후 4주 경과후의 신생골 형성 모습을 나타내는 사진(a는 20배 확대사진, b는 100배 확대 사진)이고,

도 2는 개의 치조골 결손부위에 광물성 골 이식재료와 농축혈소판 혈장겔을 함께 이식한 후 4주 경과후의 신생골 형성 모습을 나타내는 사진(a는 20배 확대사진, b는 100배 확대사진)이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 포유동물에서 골격결손 치유시 골이식을 위해 사용되는 골 형성 활성(osteogenic promoting activity)이 있는 농축혈소판 혈장 겔에 관한 것으로, 보다 상세하게는 포유동물의 분쇄된 골(pulverized bone)에 10%의 염화칼슘 또는 클루콘산 칼슘, 트롬빈 및 혈장에서 분리한 농축혈소판을 일정 비율로 혼합하여 만든 골 형성용 농축혈소판 혈장겔 및 그 제조방법에 관한 것이다.

기존의 기술로서는 혈액성분중 혈장(동종 또는 이종)과 염화칼슘 및 트롬빈을 합성하여 사용하는 섬유소 접착제(fibrin adhesive)가 있다. 국외에서 이를 이용한 기술로 과거 한독약품(한국)의 베리플라스트라는 수입품이 있었고, 현재 녹십자(주)에서는 그린플라스트라는 제품이 생산되고 있다. 그러나 이들도 각각 여러 가지 단점을 가지고 있으며 수입에 의존적이어서 사용에 제약을 받고 있는 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 포유동물의 골격치유시 골이식을 위한 새로운 골 형성촉진제 개발을 위해 연구 시험한 결과, 환자로부터 채취한 혈액을 외래에서 원심분리시켜 혈소판을 농축분리하고, 농축혈소판을 골분말(bone powder)과 함께 염화칼슘 또는 글루콘산 칼슘 및 트롬빈 혼합액과 혼합하여 제조한 겔 상태의 신규한 물질을 개발하였다. 본 발명 방법에 의해 제조된 골이식용 농축혈소판 혈장겔을 이용함으로써 악골의 골 재건시 골 이식재 수용부의 안정성을 높이고, 이식된 골의 치유반응시 혈액공급 상태를 좋게 하는 한편, 골 이식재의 초기 치유속도를 촉진시킴으로써 궁극적으로 기존의 골 이식 방법보다 더욱 안정된 좋은 예후를 얻을 수 있었다. 본 발명 골형성제는 실험동물과 환자 중례 모두에서 확인되었다.

상기 종래기술과 본 발명 기술의 가장 큰 차이점은 본 발명 기술의 경우 혈소판이 없는 혈장이 아닌 혈소판이 자가혈장을 이용한다는 것이다. 즉, 이렇게 혈소판이 농축된 혈장을 이용함으로써 혈소판에서 분비되는 PDGF 등과 같은 성장인자들이 뼈의 치유 및 신생골 형성과정을 도와줌으로써 기존의 방법보다 더 빨리 그리고 더 단단하게 새로운 뼈들이 형성되게끔 한다. 또한 동종이나 이종 혈장을 이용시 나타날 수 있는 이물면역거부반응이 자가의 혈장을 이용함으로써 전혀 나타나지 않는다.

따라서, 본 발명의 목적은 골 형성을 촉진시키고 생체적합성이 있는 골이식용 농축혈소판 혈장젤을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 농축혈소판 혈장젤의 제조방법을 제공하는 것이다.

이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 농축혈소판 혈장젤은 혈액으로부터 분리해낸 농축혈소판, 특수처리하여 제조된 동물 뼈분말(bone powder), 염화칼슘 또는 글루콘산 칼슘 및 트롬빈 혼합액을 그 필수적 구성요소로 하는데 특징이 있다.

특히, 본 발명에서 사용되는 동물 뼈분말(bone powder)의 제조방법에 대해서는 이미 본 발명자들이 특허출원(특허출원번호 제99 -52810, 동물 뼈를 이용한 골이식재 및 그 제조방법, 특허출원일: 99.11.25)한 바 있으며, 본 발명의 동물 뼈 분말(Ca -P BBP)은 상기 개시한 특허출원의 내용에 의한 방법으로 제조되어짐을 특징으로 한다. 상기 동물 뼈 분말 제조방법은 뼈에서 해면골을 채취하여 특정한 기술을 이용하여 뼈에 함유된 지방질 및 유기질을 제거해내고 방사선 멸균 과정을 거쳐 제조되어진다. 기존의 뼈대체재 제품들이 유기질을 제거하는 과정과 고온처리 과정을 거쳐 생산되는데 반해 본 발명에 사용되는 골이식 대체재(Ca -P BBP)는 열처리를 하지 않아 크리스탈의 구조가 변형되지 않고 그 형태가 잘 유지되고 있다는 특성을 가지며, 또한 화학처리 과정을 달리함으로써 지방 및 유기질이 제거되고 무기질만 남게되어 이식시 면역반응을 유발하지 않으면서 주변에 새로운 조직이 쉽게 자라들어올 수 있도록 뼈대 역할을 함으로써 신생골의 형성을 촉진하는 기능이 있다.

본 발명 농축혈소판 혈장젤에서는 혈액으로부터 채취한 농축혈소판을 사용하는데 특징이 있으며, 정상치의 혈소판 수($150 - 400 \times 10^3 / \text{dl}$)보다 혈소판이 풍부하게 농축된 농축된 혈소판(platelet rich plasma, PRP)을 염화칼슘(CaCl_2) 용액 및 트롬빈과 혼합하여 골이식 재료에 첨가한 결과 좋은 예후를 보여주었다. 본 발명에 사용된 혈소판이 고농도로 농축된 농축혈소판(platelet concentrate, PC)은 수술장에서 특수한 장비를 이용하여 얻을 수 있다. 농축혈소판이 골의 치유과정에 영향을 주는 이유는 성장요소인 혈소판 유래 성장인자(PDGF; platelet derived growth factor), 전환 성장인자 -베타(TGF -beta; transforming growth factor -beta), 그 밖의 여러가지 성장인자를 분비하기 때문이다. 분자량이 약 30,000 MW인 PDGF는 혈소판내 알파 그라눌이나 거대세포(macrophage)내에 존재하던 것이 분비되며, 조골세포, 조섬유세포(fibroblast), 혈관내피세포 등에서 세포막 수용기(cell membrane receptor)가 관찰되고, 간엽세포 분열이나 조골세포 증식 및 분화, 혹은 신생혈관 형성(neovascularization)시 작용한다. 분자량이 약 25,000 MW인 TGF -beta는 조골세포, 혈소판 등에서 분비되며 조골세포 발육의 초기단계에서 특히 작용한다. 상기 성장인자들은 이식골 치유과정시 신생혈관형성(neoangiogenesis), 세포 화학주성 및 분열촉진(stimulation of chemotaxis and mitosis), 골편 간 결합력 제공, 간세포증식(proliferation of stem cell), 피브린 망을 통한 골 전도율을 증가시키는 역할을 함으로써 초기 골 재생을 촉진시킨다.

본 발명 농축혈소판은 채취한 혈액을 $2000 \times g$ 에서 3분간 원심분리한 후, 상부 투명 혈장층과 연층을 함께 분리 채취하여 $5000 \times g$ 에서 5분간 원심분리함으로써 수득되어지고, 상기 과정에 의해 수득된 농축혈소판을 농축혈소판 혈장젤의 제조에 사용한다.

본 발명 농축혈소판 혈장젤의 제조과정은 우선 혈액으로부터 농축혈소판을 채취하고 채취된 농축혈소판 위에 동물 뼈분말(Ca -P BBP)을 뿌려준 후, 염화칼슘 또는 글루콘산과 트롬빈 혼합액을 방울씩 떨어뜨려주면서 저어줌으로써 겔을 형성시키는 과정을 포함한다.

이하, 실시예를 통해 본 발명의 구성 및 작용효과를 보다 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적일 뿐 본 발명의 범위는 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1 : 농축혈소판 혈장젤 제조법

본 실시예의 목적은 농축혈소판 혈장젤의 제조방법을 제공하는 것이다.

단계 1 : 채혈과정

에이씨이씨 액(혈액 10cc당 1.5cc)을 튜브에 미리 넣어 놓은 후, 환자(실습생)의 혈액 10cc를 채혈하여 튜브에 보관하고 성명을 기록하였다.

단계 2 : 혈소판 분리 및 농축과정

채취된 혈액이 들어간 튜브와 이에 상응되는 균형튜브(물이나 생리식염수 등을 함유)의 무게균형을 맞추고 2000×g로 3분동안 원심분리(PLACON)를 실시하였다. 상부 투명 혈장층과 연층을 함께 분리 채취하여 새로운 튜브에 넣었다. 새로운 혈장-연층 튜브의 무게에 맞게 균형 튜브의 균형을 맞추고 5000×g로 5분동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후, 연층을 포함하여 약 1cc의 농축혈소판 액을 채취하였다.

단계 3 : 농축혈소판 혈장젤 형성

채취된 농축혈소판 액을 별도의 용기에 보관하였다. 10% 염화칼슘(CaCl_2) 용액(혹은 글루콘산 칼슘)과 트롬빈 액을 1:1의 비율로 섞어서 혼합액(A)을 제조한다. 사용직전에 채취된 농축혈소판 액에 특허출원 제99-52810호의 방법에 의해 제조된 동물뼈 분말(Ca-P BBP)을 첨가하고 상기 염화칼슘과 트롬빈의 혼합액(A)을 방울씩 떨어뜨려가면서 저어준 결과 겔이 형성되었다. 최종적으로 농축혈소판 액과 혼합액(A)는 6:1(v/v)의 비율로 섞어줌으로써 농축혈소판 혈장젤을 제조할 수 있었다. 상기 제조된 농축혈소판 혈장젤을 용도에 따라 적절히 사용하였다.

실시예 2 : 농축혈소판 혈장젤을 사용한 골 형성

본 실시예의 목적은 농축혈소판 혈장젤의 골격결손 부위 이식시 골형성 촉진효과를 확인하는 것이다. 본 실시예에서는 생후 13개월에서 16개월이 된 체중 15kg 내외의 비글 개(beagle dog) 5마리를 사용하였으며, 실험 시작전 이들의 치주조직은 임상적으로 양호하였고 전신적 질환이 없는 건강한 상태였다. 본 실시예의 실험재료로는 송아지 뼈에서 추출한 무기 골이식재인 Ca-P BBP(bovine bone power; BBP의 제조방법에 관하여는 본 출원인의 국내특허출원 제99-52810호(99.1125 출원) 참조)에 질산칼슘(calcium nitrate)과 인산암모늄(ammonium sulfate)을 이용한 인산칼슘(calcium phosphate)으로 코팅하여 사용하였다.

실험 1 : 실험적 치주염의 유발

실험동물은 Ketamine HCl(유한양행, 한국) 0.2ml/kg을 근육주사하여 진정시킨 후 5% 포도당 주사액(100cc/hour, IV)을 외과적 수술이 끝날 때까지 투여하였다. 마취 유지를 위하여 Ketamine HCl(0.1ml/kg, IV)과 Xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, 0.1ml/kg, IM)을 평균 20분 간격으로 번갈아 투여하였다. 전신 마취 후 2% Lidocaine HCl(Epinephrine 1:800,000)로 실험 부위인 하악 좌측 제3, 4, 5 소구치 부위를 침윤마취하였다. 그 후 실험부위 협측에 치은 열구를 따라 절개하여 전층판막을 형성하였다. Diamond round bur를 사용하여 제3, 4, 5 소구치의 협측 치근 이개부에 2급 이개부 결손을 길이, 너비, 깊이를 각각 4mm씩 형성하였다. 결손부위에 Stopping을 넣고 판막으로 완전히 덮은 후 4-0 비크릴(vicryl) 봉합사로 봉합하여 2개월간 방치하였다.

실험 2 : 혈소판 농축 혈장의 제작

2개월 후, 치주염 유발시와 동일한 방법으로 전신마취를 시행하고 각 동물의 정맥에서 10cc의 혈액을 채취하였다. 채취시 0.01cc의 헤파린이 들어있는 주사기를 사용하여 혈액의 응고를 방지하였다. 채취된 혈액을 3분동안 $3000 \times g$ 로 원심분리하여 상층의 혈장과 하층의 적혈구층으로 나뉘면 피펫을 이용하여 상층만 분리하여 다시 5분간 $5000 \times g$ 로 원심분리하였다. 그러면 최상층에 혈장이 모이고, 중층에 buffy coat, 최하층에 다시 여분의 적혈구가 남게 된다. 최상층의 혈장과 여분의 적혈구를 제외한 상층의 혈소판 농축 혈장층을 다시 피펫으로 분리하여 준비하였다. 채득된 혈액 10cc에서 만들어진 혈소판 농축 혈장 1cc는 외과적 수술직전 트롬빈과 염화칼슘 혼합액 1/6cc와 섞어 사용하였다.

실험 3 : 외과적 수술

치주염의 유발시와 같은 방법으로 하악 좌측 제3, 4, 5 소구치 부위에 침윤마취 후, 전층 판막을 거상하였다. 남아있는 stopping과 육아조직과 치석을 제거하고 큐렛과 roto round bur를 이용해 치근활택술을 시행하였다. 1/4 round bur를 이용하여 결손부 최하방, 치조골능 부위에 치아면을 따라 notch를 형성하여 조직학적 검경 시 기준점이 되도록 하였다.

대조군인 하악 좌측 제5 소구치에는 치은판막술만을 시행하였고, 실험 1군의 하악 좌측 제3소구치에는 골이식재인 Ca-P BBP를 이식하였으며, 실험2군의 하악 좌측 제4소구치에는 상기 기재한 혈소판농축 혈장과 트롬빈, 염화칼슘 혼합액을 Ca-P BBP와 섞어 이식하였다. 판막으로 이식재와 결손부를 충분히 덮을 수 있도록 하여 4-0 비크릴 봉합사로 봉합하였다. 수술이 끝난 후 항생제(gentamycin sulfate)와 진통제(phenyl butazone)를 투여하였다.

실험동물은 시술 후 4주에 3마리씩, 8주에 2마리를 희생시켰다. pH 7.4 인산완충액을 이용한 2% 파라포름알데히드 및 2.5% 글루타르알데히드의 혼합액을 이용해 두부를 관류고정하고 실험부위를 포함한 악골절편을 적출하여 혼합액에서 다시 고정하였다. 물로 수세하고 알코올로 탈수시킨 후 5% 질산을 사용하여 탈회하고 통법에 따라 파라핀에 포매하여 $6\mu m$ 의 두께로 근원심축으로 절편을 만들어 고모리 트리콤(Gomori's trichome)법으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과를 도 1(a,b) 및 도 2(a,b)에 도시하였다. 도 1b에서 이식재 입자 주위의 골 형성 상태가 미약하게 관찰되는 것을 알 수 있으나, 도 2b에서 이식재 입자 주위에 신생골 형성상태가 광물성 이식재만을 이식한 경우보다 훨씬 명확하고 확실하게 나타남을 확인할 수 있다.

발명의 효과

이상 살펴본 바와 같이 본 발명 농축혈소판 혈장젤을 골결손부위에 이식할 경우 골 형성능이 우수할뿐만 아니라, 생체적합성도 있어 의학산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

혈소판, 포유동물의 뼈 분말, 염화칼슘 또는 글루콘산칼슘 및 트롬빈을 포함하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 골결손 치유시 골이식을 위한 골 형성용 조성물.

청구항 2.

(a)포유동물로부터 혈액을 채취하고 채취한 혈액을 $2000 \times g$ 에서 1차 원심분리하고 난 후 원심분리된 상부 투명 혈장층 및 연층 액을 분리 채취하고 난 후, 상기 분리 채취한 액을 $5000 \times g$ 에서 2차 원심분리하여 농축혈소판 액을 채취하는 단계;

(b)상기 채취된 농축혈소판 액에 포유동물 뼈 분말을 혼합하는 단계;

(c)10%의 염화칼슘 용액 또는 글루콘산 칼슘과 트롬빈 액을 1:1 (v/v)의 비율로 섞어 혼합액을 제조하는 단계; 및

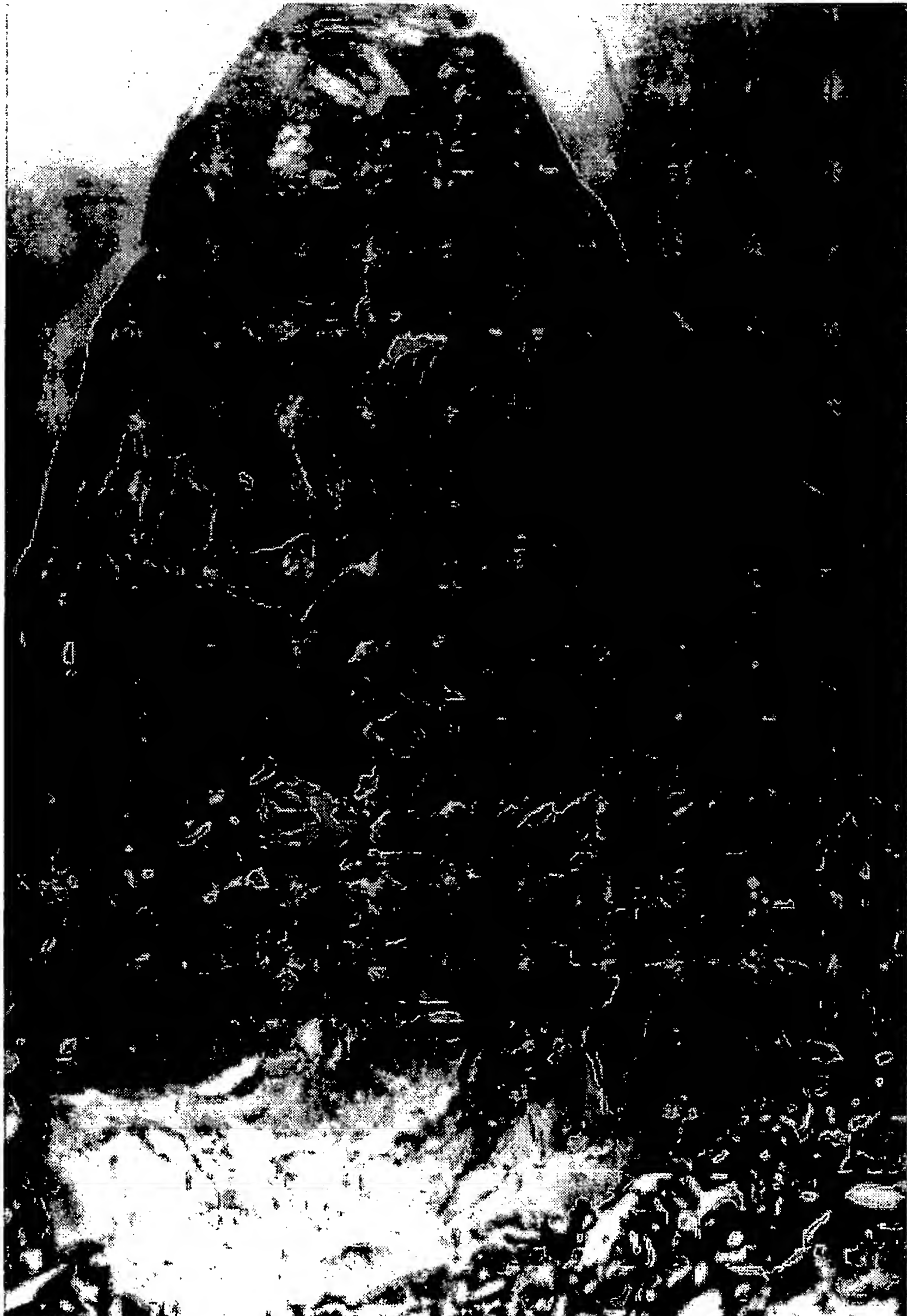
(d)상기 (b)단계에 의해 제조된 뼈 분말 포함 농축혈소판 액에 상기 (c)단계에 의해 제조된 혼합액을 방울씩 떨어뜨리며 저어주면서 겔을 형성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 포유동물의 골격결손 치유시 골이식을 위한 농축혈소판 혈장겔의 제조방법.

청구항 3.

상기 제2항의 방법에 의해 제조된 농축혈소판 혈장겔.

도면

도면 1a



도면 1b



도면 2a



도면 2b



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.